



**STUDI HIDROLISIS PROTEIN DAGING IKAN LEMURU (*Sardinella sp.*)
OLEH EKSTRAK KULIT BUAH NANAS (*Ananas Comusus Var. dulcis*)
TERHADAP VARIASI WAKTU INKUBASI**

SKRIPSI

Diajukan Untuk memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program
Sarjana Sains Jurusan Kimia Fakultas Matematika
dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Oleh :

Dian Kusumaningsih

NIM. 981810301040

Hadiah
Pembelian
Tgl 4 JUL 2003
Klass
664.94
kus
s e,

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2003

MOTTO

♥ *"Percayalah kepada TUHAN dengan segenap hatimu dan janganlah bersandar kepada pengertianmu sendiri. Akulah Dia dalam segala lakumu, maka Ia akan meluruskan jalanmu" (Amsal 3: 5-6).*

♥ ...Janganlah takut, sebab Aku menyertai engkau, janganlah bimbang, sebab Aku ini Allahmu, Aku akan meneguhkan bahkan akan menolong engkau; Aku akan memegang engkau dengan tangan kanan-Ku yang membawa kemenangan (Yeremia 41: 10)..

♥ *...TETAPI INI YANG KULAKUKAN; AKU MELUPAKAN APA YANG TELAH DIBELAKANGKU DAN MENGARAHKAN KEPADA APA YANG DIHADAPANKU. (FILIPI 3: 13 B).*

PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan untuk

1. **Tuhan Yesus Kristus** sebagai Pengharapanku, Kekasihku dan Kekuatanku.
2. Bapak dan Ibuku yang selalu berdoa, memberikan dorongan semangat dan dukungan dalam setiap langkahku
3. Kakak-kakakku yang selalu menyayangi dan memberikan dukungan penuh setiap keputusan dan langkahku.
4. Teman-teman sepelayanan di **PERKANTAS**, keluarga besar **PMK FKIP-MIPA** terkhusus adik **KTB "Victory"** yang selalu memberikan semangat dan dukungan doa.
5. Teman-Teman Graha Generasi 2000 untuk dukungan dalam segala hal.
6. Teman-Teman tim Protease untuk dukungan dan kekompakan sebagai tim yang baik..
7. Almamater yang kubanggakan

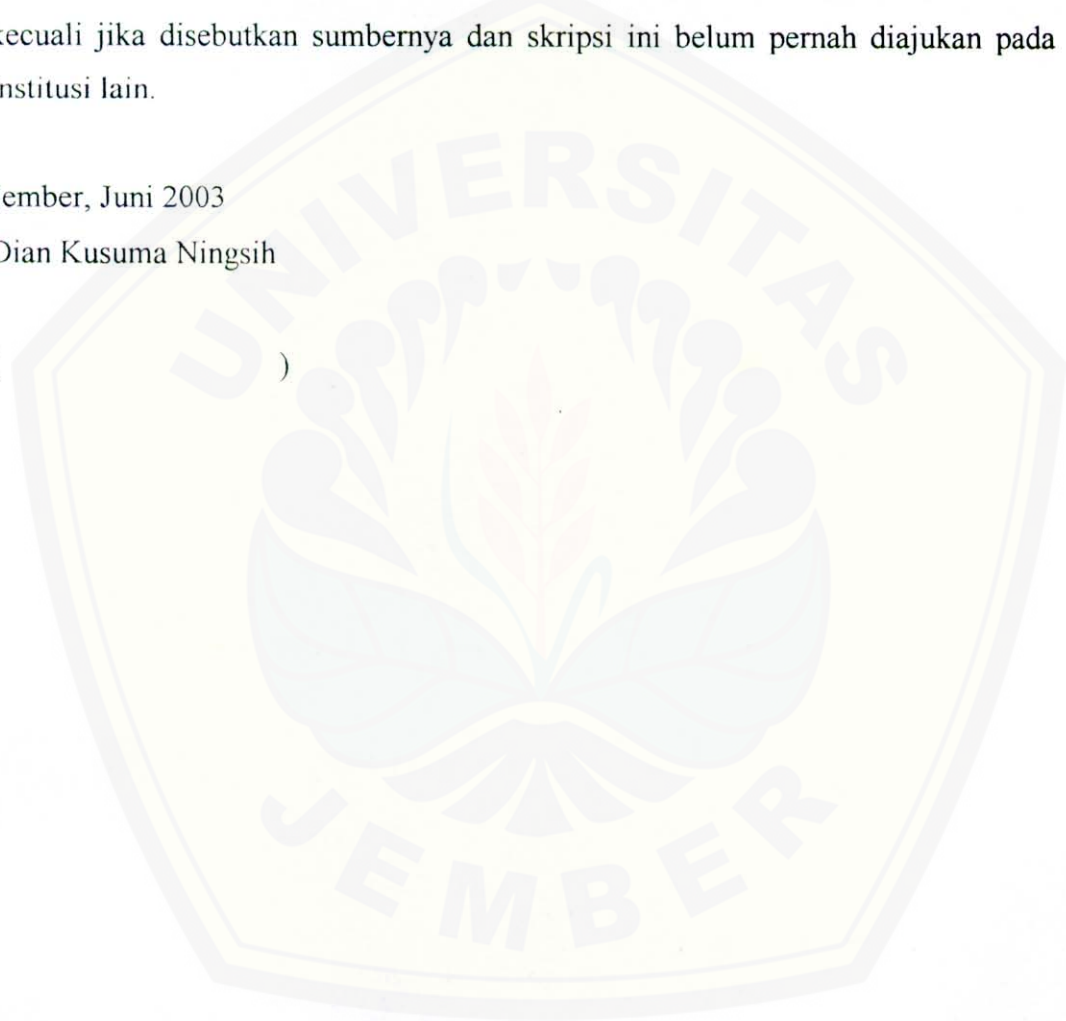
DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil kerja atau penelitian mulai bulan November 2002 sampai bulan Februari 2003 di laboratorium biologi molekuler dan laboratorium biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Bersama ini, saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Juni 2003

Dian Kusuma Ningsih

()



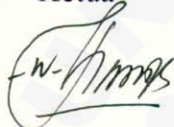
PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
pada :

Hari : JUM'AT
Tanggal : 27 JUN 2003
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji

Ketua



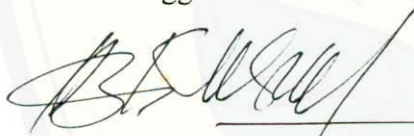
drh. Wuryanti Handayani, M. Si
NIP. 131 459 744

Sekretaris



A. A. Istri Ratnadewi, S. Si, M. Si
NIP. 132 162 523

Anggota



Drs. Bambang Kuswandi, M. Sc, Ph. D
NIP. 131 412 918

Anggota




Drs. Busroni, M. Si
NIP. 131 945 805

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember




Ir. Sumadi, M. S
NIP. 130 368 784

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas segala limpahan karunia dan anugerah-Nya sehingga penulisan skripsi dengan judul "**Studi Hidrolisis Protein Daging Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*) Oleh Ekstrak Kulit Buah Nanas (*Ananas comusus Var. dulcis*) Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi**" dapat terselesaikan dengan baik. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Jember,
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember,
3. Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember ,
4. drh. Wuryanti Handayani M.Si. dan Anak Agung Istri Ratnadewi S.Si, M.Si, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota atas arahan dan kesabaran yang diberikan,
5. Drs. Bambang Kuswandi. M.Sc. Ph.D dan Drs. Busroni M.Si, selaku Dosen Penguji atas petunjuk dan saran yang diberikan,
6. Ir. Neran M.Kes selaku Kepala Laboratorium Biokimia dan Ir. Bambang Sugiharto M.Agr.Ph.D selaku Kepala Laboratorium Biologi Molekuler beserta staf atas bantuan yang diberikan selama melakukan penelitian,
7. Bapak dan ibu, kakak-kakakku, dik Madha dan keluarga besarku atas kasih sayang, doa dan semangat yang diberikan,
8. Rekan-rekan seperjuangan angkatan 98 khususnya TIM Protease, rekan-rekan dilaboratorium biokimia, analitik, fisik, anorganik dan organik serta teman-teman Graha Generasi 2000 atas bantuan dan semangat yang diberikan.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita bersama.

Jember, Juni 2003

Penyusun,

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN MOTTO.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN DEKLARASI.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
ABSTRAK.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Enzim Bromelin.....	4
2.2 Ekstraksi Enzim.....	8
2.3 Aktivitas Enzim.....	10
2.4 Ikan Lemuru.....	12
2.5 Penentuan Kadar Protein.....	13
2.6 Pemisahan Protein.....	15

BAB III METODOLOGI.....	18
3.1 Tempat dan Waktu.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Alat.....	18
3.2.2 Bahan	18
3.3 Diagram Alir.....	19
3.4 Metode Penelitian.....	20
3.4.1 Ekstraksi <i>crude</i> enzim bromelin dari kulit buah nanas	20
3.4.2 Aktivitas <i>crude</i> enzim bromelin dari kulit buah nanas	20
3.4.3. Inkubasi daging ikan lemuru secara enzimatik.....	22
3.4.4. Penentuan protein terlarut dengan metode titrasi formol.....	22
3.4.5. Penentuan pita-pita protein hasil hidrolisis daging ikan lemuru dengan metode elektroforesis.....	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1 Ekstrak <i>crude</i> enzim bromelin dari kulit buah nanas.....	25
4.2 Aktivitas <i>crude</i> enzim bromelin dari kulit buah nanas.....	26
4.3 Protein daging ikan lemuru terhidrolisis	29
4.3.1 Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap kadar protein terlarut daging ikan lemuru terhidrolisis	29
4.3.2 Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap elektroforegram pita-pita protein daging ikan lemuru .	31
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

	URAIAN	HAL.
Tabel 1.	Kandungan enzim bromelin dalam 100 gram buah nanas	4
Tabel 2.	Komposisi ikan lemuru dalam 100 gram ikan lemuru	13
Tabel 3.	Kandungan asam amino dari protein ikan	13
Tabel 4.	Rendemen <i>crude</i> enzim bromelin kulit buah nanas dalam 50 mL larutan	25
Tabel 5.	Aktivitas <i>crude</i> enzim bromelin kulit buah nanas dalam 50 mL larutan	27
Tabel 6.	Jarak pita-pita protein daging ikan lemuru	33
Tabel 7.	Konsentrasi akhir ammonium sulfat: penjumlahan pada 0 ⁰ C	42
Tabel 8.	Data absorbansi sampel, blanko dan standart pengukuran aktivitas <i>crude</i> enzim bromelin	43
Tabel 9.	Data volume NaOH dan penentuan kadar protein terlarut	44

DAFTAR GAMBAR

	URAIAN	HAL.
Gambar 1.	Kinetika reaksi hidrolisis enzim terhadap substrat	5
Gambar 2.	Mekanisme reaksi hidrolisis enzim sulfidril terhadap polipeptida	6
Gambar 3.	Hubungan penurunan kelarutan protein terhadap peningkatan konsentrasi garam	10
Gambar 4.	Mekanisme reaksi protein dengan formaldehide	14
Gambar 5.	Reaksi polimerisasi akrilamida dan N, N'-metilene bis akrilamida untuk membentuk <i>cross linking</i> gel poliakrilamida	16
Gambar 6.	Diagram alir	19
Gambar 7.	Reaksi reduksi folin oleh tirosin	28
Gambar 8.	Hubungan waktu inkubasi terhadap kadar protein daging ikan lemuru secara enzimatis	30
Gambar 9.	Elektroforegram pita-pita protein daging ikan lemuru terhadap variasi waktu inkubasi.	31
Gambar 10.	Elektroforegram waktu inkubasi 0 hari	45
Gambar 11.	Elektroforegram waktu inkubasi 3 hari	46
Gambar 12.	Elektroforegram waktu inkubasi 5 hari	46
Gambar 13.	Elektroforegram waktu inkubasi 7 hari	47

DAFTAR LAMPIRAN

URAIAN	HAL.
Lampiran 1. Preparasi larutan	39
Lampiran 2. Teknik pengendapan oleh ammonium sulfat	42
Lampiran 3. Penentuan aktivitas <i>crude</i> enzim bromelin dari kulit buah nanas	43
Lampiran 4. Penentuan kadar protein terlarut daging ikan lemuru terhidrolisis	44
Lampiran 5. Daftar gambar elektroforegram	45

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

kDa	: kilo Dalton
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Elektroforesis
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	: N, N, N', N'-tetrametilene diamine
CBB	: Coomasie Brilliant Blue
APS	: Ammonium Persulfate
Crude	: Ekstrak Kasar
Stacking gel	: Gel Atas
Separating gel	: Gel Bawah



ABSTRAK

“ Studi Hidrolisis Protein Daging Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*) Oleh Ekstrak Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* Var. *dulcis*) Terhadap Variasi Waktu Inkubasi”, Dian Kusumaningsih, 981810301040, Skripsi, Juni 2003, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Studi hidrolisis protein daging ikan lemuru (*Sardinella sp.*) oleh ekstrak kulit buah nanas (*Ananas comosus* Var. *dulcis*) terhadap variasi waktu inkubasi telah dilakukan. Ekstraksi kulit nanas menggunakan metode ekstraksi awal dan fraksinasi. Hasil fraksinasi selanjutnya ditentukan aktivitasnya. Fraksi dengan aktivitas tertinggi digunakan untuk hidrolisis daging ikan lemuru dengan waktu inkubasi yang bervariasi. Hasil hidrolisis tersebut ditentukan kadar protein terlarutnya dengan metode titrasi formol dan sub unit protein dengan metode elektroforesis. Hasil dari penelitian ini bahwa rendemen tertinggi pada fraksi 40-80% (1.010 gram untuk 50 mL larutan) dan aktivitas tertinggi pada fraksi 40-80 % (0.192 Unit). Semakin lama waktu inkubasi menyebabkan semakin meningkatnya hasil hidrolisis daging ikan lemuru. Hal ini terlihat pada peningkatan kadar protein terlarut dan tertinggi pada hari ke 5 (6.875%) serta penampakan sub unit protein pada elektroforesis yang semakin tipis (peningkatan jarak dari gel atas)

Kata kunci : enzim bromelin, protein, hidrolisis, elektroforesis



I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ikan merupakan salah satu sumber daya alam yang memegang peranan penting dalam pemenuhan kebutuhan gizi masyarakat khususnya protein karena memiliki kandungan protein yang tinggi. Menurut Meyer (1974) bahwa protein ikan mengandung asam-asam amino yang sangat dibutuhkan tubuh sehingga konsumsi 20-40 gram protein ikan perhari dalam makanan cukup memenuhi kebutuhan protein.

Berdasarkan Laporan Dinas Perikanan Jawa Timur (1998) bahwa ikan lemuru (*Sardinella sp.*) sebagai produk perikanan terbesar dengan jumlah 153.985 ton yang terus meningkat setiap tahunnya. Dilain pihak, harga jual ikan lemuru semakin menurun setiap tahunnya yakni pada tahun 2000 sebesar Rp.2.200/kg; tahun 2001 sebesar Rp.2.084/kg dan tahun 2002 sampai 2003 sebesar Rp. 600/kg (Badan Pusat Statistik, 2003). Penurunan harga jual tersebut karena ikan lemuru mudah busuk, bersisik tebal dan berduri banyak .

Saat ini usaha peningkatan harga jual ikan dilakukan dengan cara penganeekaragaman hasil olah ikan misalnya pengasinan, pemindangan, kecap ikan dan lain-lain. Semakin meningkatnya teknologi pangan, pengolahan ikan juga mengalami perkembangan yaitu secara enzimatik. Menurut Hendritomo dkk. (2000) bahwa pengolahan ikan secara enzimatik dapat meningkatkan kualitas hasil olahan ikan

Pengolahan ikan dengan secara enzimatik merupakan pengolahan dengan bantuan enzim yaitu enzim proteolitik. Enzim proteolitik merupakan enzim yang menghidrolisis molekul protein besar menjadi molekul lebih kecil dan sederhana. Dengan demikian pengolahan ikan yang dihasilkan secara enzimatik memiliki molekul protein yang lebih sederhana sehingga mempertinggi daya cerna protein dalam tubuh (Indrawaty, 1983).

Enzim bromelin merupakan salah satu enzim proteolitik yang terdapat pada tumbuhan nanas yaitu kulit, daging, buah, dan tangkai (Meggy, 1992). Dilain pihak, limbah kulit buah nanas sisa pengolahan buah di pasar maupun di industri

pengolahan buah kaleng terus meningkat setiap tahunnya sehingga perlu perhatian dan penanganan. Menurut Yandri (1987) bahwa aktivitas spesifik dari kulit nanas sebesar 32.2 Unit/mg. Apabila enzim bromelin dari kulit buah nanas dapat diekstrak dan digunakan untuk menghidrolisis protein ikan lemuru, maka kulit buah nanas dapat digunakan sebagai bahan dasar pengolahan ikan menjadi kecap ikan.

Hidrolisis protein oleh enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satunya yaitu waktu inkubasi. Berdasarkan permasalahan diatas, maka dilakukan penelitian tentang "Studi hidrolisis protein daging ikan lemuru (*Sardinella sp*) oleh ekstrak kulit buah nanas (*Ananas Comusus Var. dulcis*) berdasarkan variasi waktu inkubasi".

1.2. Rumusan masalah

1. Bagaimanakah ekstraksi *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanas ?
2. Berapakah aktivitas *crude* enzim bromelin tersebut terhadap substrat kasein?
3. Bagaimanakah pengaruh variasi waktu inkubasi *crude* enzim bromelin tersebut terhadap hasil hidrolisis daging ikan lemuru ?

1.3. Batasan masalah

1. Daging ikan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daging ikan lemuru (*Sardinella sp.*) dari tempat pelelangan ikan Puger Jember.
2. Kulit buah nanas yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari buah nanas bogor (*Ananas comusus Var. dulcis*) atau berumur 6 bulan dari perkebunan nanas Tanggul Jember.

1.4. Tujuan penelitian

1. Mempelajari ekstraksi *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanas.
2. Menentukan aktivitas *crude* enzim bromelin tersebut terhadap substrat kasein.
3. Mempelajari pengaruh variasi waktu inkubasi *crude* enzim bromelin tersebut terhadap hasil hidrolisis daging ikan lemuru.

1.5 Manfaat

1. Memberikan pengetahuan kepada para peneliti khususnya dalam bidang biokimia dan bidang-bidang ilmu yang lainnya tentang pengaruh variasi waktu inkubasi ekstrak *crude* enzim bromelin terhadap protein daging ikan lemuru yang terhidrolisis.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat khususnya perusahaan pengolahan ikan menjadi kecap ikan tentang potensi ikan lemuru dan kulit nanas sebagai bahan dasar pembuatan kecap ikan secara enzimatis sehingga diharapkan masalah harga jual ikan lemuru dan limbah kulit mendapatkan penanganan dan kebutuhan gizi masyarakat khususnya protein dapat terpenuhi.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim bromelin

Enzim adalah biokatalisator yang bekerja meningkatkan kecepatan reaksi tanpa mengubah konstanta keseimbangannya. Berdasarkan sumbernya, macam-macam protease yaitu hewani, nabati dan mikroba. Sumber protease nabati meliputi papain, ficin dan bromelin; sedangkan sumber hewani seperti tripsin; dan mikroba seperti khimopapain (Winarno, 1999).

Ananas comusus merupakan sumber protease. Aktivitas enzim protease dari tanaman nanas telah dikenal sejak abad 19, terutama pada batangnya. Protease yang diisolasi dari famili *Bromeliaceae* disebut bromelin. Famili *Bromeliceae* mengandung enzim proteolitik pada semua bagian tanaman yaitu batang, buah, tangkai dan daun dengan jumlah yang berbeda-beda. Kandungan enzim bromelin dalam buah nanas dapat dijelaskan pada tabel 1 dibawah ini

Tabel 1. Kandungan bromelin pada tanaman nanas dalam 100 gram nanas

Bagian tanaman	Jumlah (gram)
Buah utuh masak	0.06 – 0.080
Daging buah masak	0.08 – 0.125
Kulit buah	0.05 – 0.075
Tangkai	0.04 – 0.060
Batang	0.10 - 0.600
Buah utuh mentah	0.04 – 0.060
Daging buah mentah	0.05 – 0.070

Sumber : Omar dkk., 1978

Enzim bromelin seperti juga ficin dan papain merupakan protease sulfidril yaitu enzim protease yang mempunyai sisi aktif residu asam amino gugus sulfidril

Bromelin batang = Ser-Val- Lys-Asn-Gen-Asn-Pro-Cys-Gly-Aln-Cys*-Trp

Papain = Pro-Val-Lys-Asn-Gen-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser- Cys*-Trp

Ficin = Pro-Ile-Arg-Gln-Gen-Gly-Gen-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp

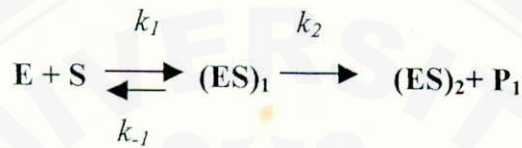
Cys* adalah residu sisteinil pada sisi aktif (Reed, 1975).

Enzim bromelin bersifat endoprotease yaitu enzim yang dapat menguraikan ikatan peptida pada bagian dalam rantai protein sehingga

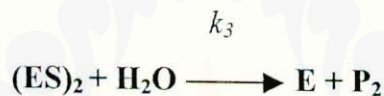
menghasilkan peptida dan polipeptida (Winarno, 1999). Enzim bromelin dapat menghidrolisis ikatan peptida secara spesifik pada protein yang memiliki gugus R yaitu *lisin, alanin, tirosin dan glisin* (Mathews and Van Holde, 1990). Sebagai enzim hidrolase maka enzim bromelin memerlukan air dalam menghidrolisis ikatan peptida (Colby, 1985).

Menurut Cykes, dalam Santoso (1997) bahwa kinetika reaksi hidrolisis enzim terhadap substrat dapat dijelaskan pada gambar 1 dibawah ini :

Tahap I : Asilasi



Tahap II : Deasilasi



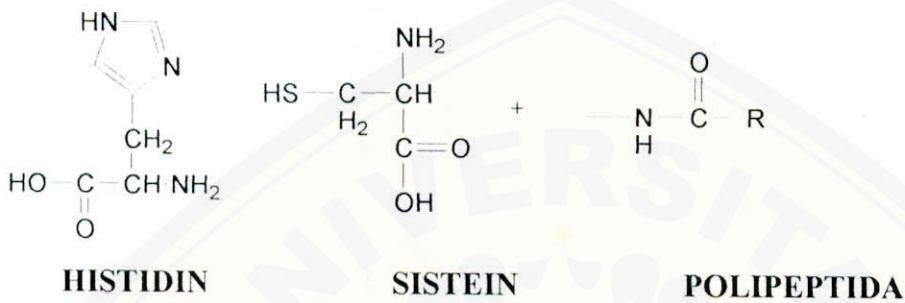
Gambar 1. Kinetika reaksi hidrolisis enzim terhadap substrat

Substrat S diikat secara irreversible (dapat balik) pada enzim E membentuk kompleks enzim substrat $(ES)_1$ dan menghasilkan kompleks enzim asil $(ES)_2$ dan produk pertama P_1 . Tahap ini disebut tahap **asilasi**. Pada kompleks enzim asil $(ES)_2$, gugus asil terikat pada sisi aktif gugus tiol melalui ikatan tioester. Reaksi selanjutnya terjadi dengan adanya H_2O yang bergabung dengan enzim asil menghasilkan produk P_2 dan enzim dibebaskan kembali. Tahap ini disebut **deasilasi**.

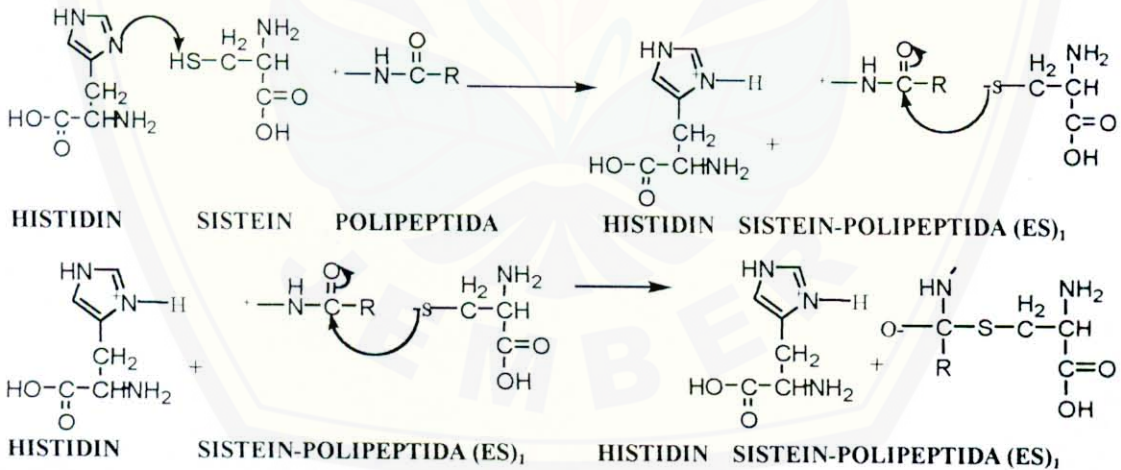
Menurut Matthew and Van Holde (1990) bahwa mekanisme reaksi hidrolisis enzim protease sulfidril terhadap polipeptida dapat dijelaskan pada gambar 2 dibawah ini.

1. Reaksi asilasi

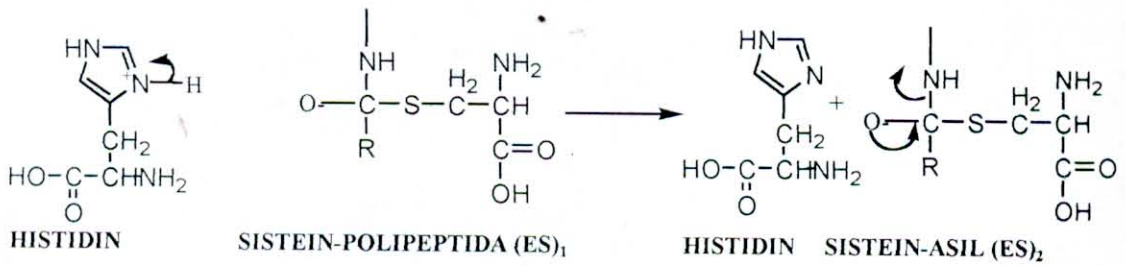
a. *Difusi substrat (polipeptida) ke enzim (sistein)* dipengaruhi oleh letak atau orientasi .



b. *Ikatan substrat dengan enzim*; atom N dari imidazol asam amino histidin menyerang atom H dari sistein sehingga bermuatan positif parsial dan S dari sistein menjadi kelebihan elektron dan menyerang C karboksil dari polipeptida.

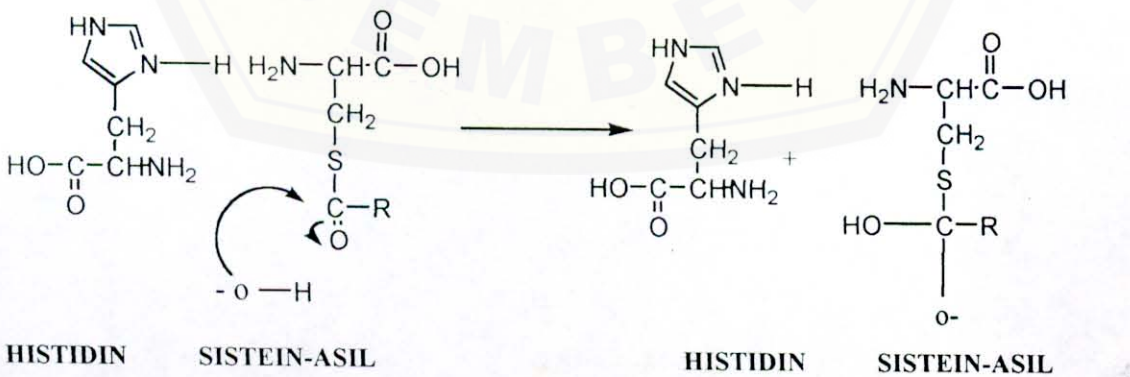
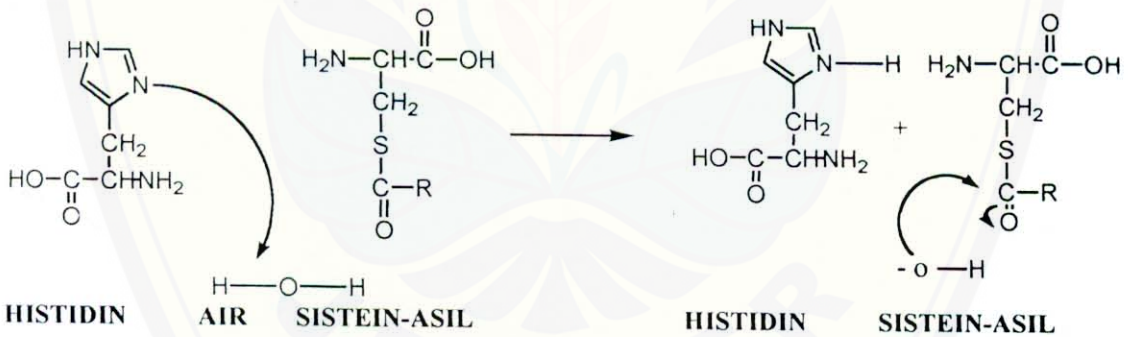


c. *Ikatan enzim substrat diputus dan produk pertama dilepas*; ikatan S dan C (ES) menyebabkan satu tangan C-O terputus dan atom O bermuatan negatif parsial. Atom H positif yang terikat N imidazol selanjutnya diserang oleh -NH₂ dari polipeptida membentuk -NH₂ dan sistein -asil. Mekanisme reaksinya dijelaskan pada halaman selanjutnya.

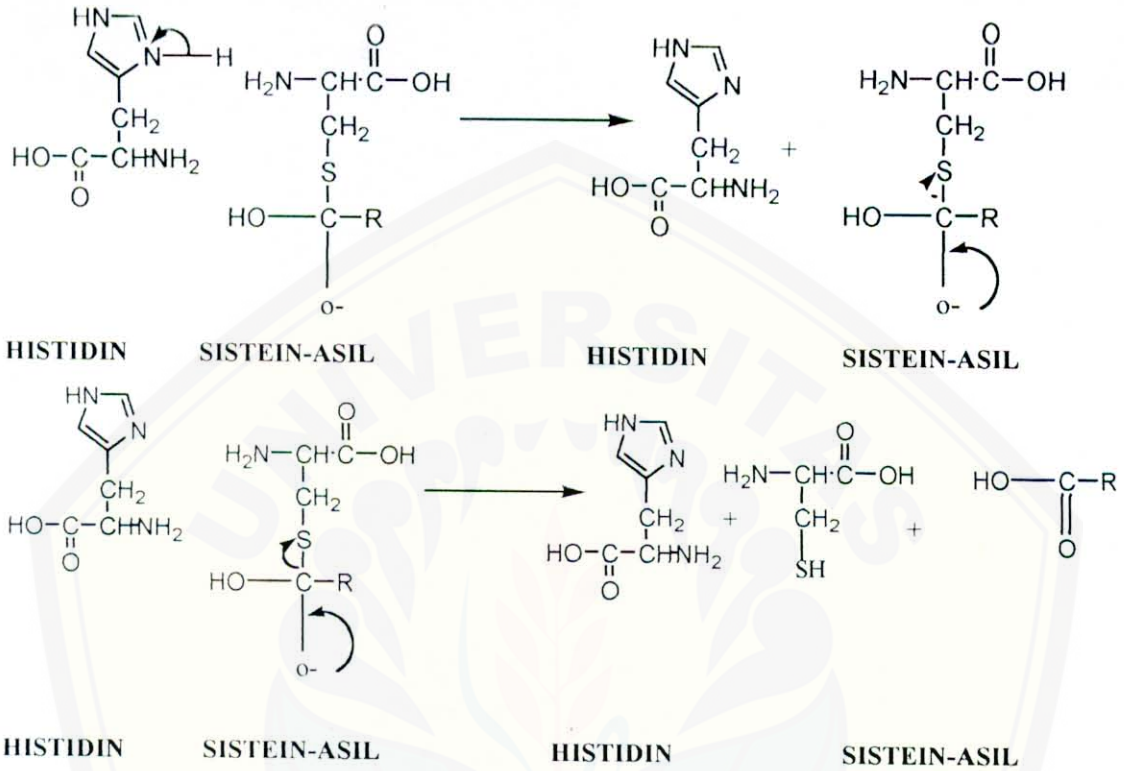


2. **Reaksi Deasilasi**

d. *Reaksi dengan air*; N dari imidazol sebagai nukleofil, menyerang H dari air. OH⁺ akan menyerang atom C dari sistein-asil sehingga atom O bermuatan negatif parsial..



e. Pemutusan ikatan enzim asil dan produk dilepaskan; S dari enzim asil bertindak sebagai nukleofil dan menyerang atom H yang berikatan dengan N imidazol dan melepaskan asil dan enzim kembali.



Gambar 2. Mekanisme reaksi hidrolisis enzim sulfidril terhadap polipeptida

2.2. Ekstraksi enzim protease

Ekstraksi enzim bertujuan untuk memisahkan enzim dari jaringannya. Ekstraksi enzim dilakukan pada suhu rendah (kurang lebih 4⁰C) karena enzim sering tidak stabil pada suhu yang lebih tinggi (Palmer, 1991).

Ekstraksi enzim tersebut tergantung pada letak enzim di dalam jaringannya. Ekstraksi enzim ekstraseluler dilakukan dengan sentrifugasi. Enzim ekstraseluler dapat diekstraksi dengan cara penyadapan misalnya enzim papain dan ficin. Apabila enzim yang akan diekstraksi terletak di dalam sel atau intraseluler maka perlu pemecahan dinding sel dengan blender yang kemudian mengekstraksinya (Whitaker, 1994).

Kondisi ekstraksi harus dijaga pada kisaran pH tertentu maka diperlukan buffer untuk mengekstrak (Palmer, 1991). Selanjutnya Whitaker menambahkan untuk ekstraksi enzim intraseluler dari jaringan tanaman harus ditambahkan buffer untuk menjaga pH disekitar netral. Buffer ini bertujuan untuk melindungi enzim dari pengaruh asam yang dilepaskan oleh sel-sel selama ekstraksi. Untuk mengekstraksi enzim bromelin dari bonggol nanas digunakan larutan buffer fosfat sekitar pH 7 dengan kuat ionik 0.1-0.5 M.

Hasil ekstraksi enzim untuk selanjutnya dapat dimurnikan. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan baik dengan pelarut organik seperti etanol atau aseton maupun metode fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat (Robyt and White, 1987). Etanol dan aseton merupakan pelarut organik yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi enzim dibandingkan pelarut organik lainnya. Penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein mengakibatkan kecenderungan interaksi molekul-molekul protein meningkat dibandingkan dengan interaksi molekul protein dengan air sehingga protein akan mengendap tetapi pelarut organik dapat mendenaturasi protein enzim. Garam ammonium sulfat sering digunakan untuk pengendapan protein enzim melalui peristiwa *salting out* karena kelarutannya tinggi, tidak beracun, murah dan dapat menstabilkan enzim (Dixon and Webb, dalam Fox, 1991). Menurut Matthew and Van Holde (1990) bahwa kelarutan protein sangat dipengaruhi oleh konsentrasi garam dalam larutan. Konsentrasi garam yang tinggi maka kelarutan protein dalam pelarut akan turun karena penurunan aktivitas pelarut akibat interaksi antar protein lebih tinggi daripada interaksi protein dengan pelarut sehingga protein akan mengendap. Penurunan kelarutan protein terhadap kenaikan konsentrasi garam dapat dijelaskan pada persamaan berikut ini:

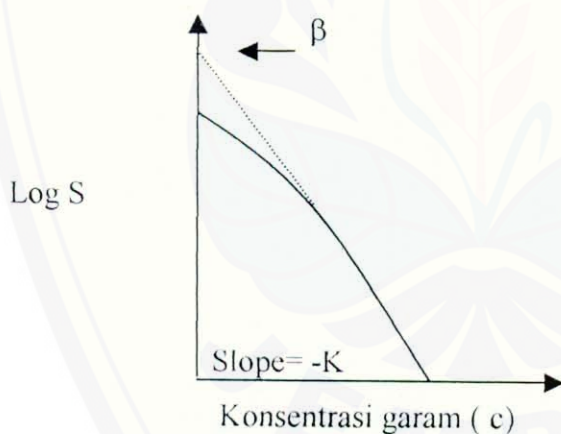
$$\text{Log } S = \beta - Kc$$

S adalah kelarutan protein, c merupakan konsentrasi garam dan K adalah konstanta. Hubungan penurunan kelarutan protein terhadap kenaikan konsentrasi garam dapat ditunjukkan pada gambar 3. Pengendapan protein berdasarkan perbedaan hidrofobisitas protein, protein yang lebih bersifat hidrofob maka konsentrasi garam yang diperlukan lebih rendah daripada protein yang bersifat

hidrofilik. Protein yang bersifat hidrofobik berada di bagian dalam struktur protein globular dan protein yang bersifat hidrofilik berada di bagian luar struktur protein globular. Menurut Lehninger (1990) bahwa sifat protein globular berdasarkan letaknya ada tiga yaitu

1. **Hidrofobik** terletak di bagian dalam struktur protein globular, meliputi aspartat, glutamat, asparagin, glutamin, lisin, arginin dan histidin.
2. **Hidrofilik** terletak di bagian luar struktur protein globular, meliputi fenilalanin, leusin, isoleusin, metionin, valin, triptofan.
3. **Polaritas antara** terletak di bagian dalam atau di bagian luar struktur protein globular, meliputi prolin, treonin, serin, sistein, alanin, glisin, tirosin.

Menurut Foster, Dunnill and Lily dalam Azis dkk. (1992) bahwa grafik penurunan kelarutan protein terhadap peningkatan konsentrasi garam dapat dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 3. Grafik hubungan penurunan kelarutan protein terhadap kenaikan konsentrasi garam.

2.3. Aktivitas enzim

Penentuan aktivitas enzim dengan cara menentukan banyaknya produk yang dihasilkan per satuan waktu atau banyaknya substrat yang dikatalisis per satuan waktu (Whitaker, 1994). Menurut Boyer (1993) bahwa satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya substrat (mikro mol) yang dapat menghasilkan produk tiap menit pada kondisi optimum (pH, temperatur, kekuatan ionik dan konsentrasi substrat). Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim per miligram protein.

Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim, nilainya meningkat selama kemurnian suatu enzim dan menjadi maksimal dan konstan jika enzim sudah berada pada keadaan murni (Lehninger, 1990).

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan pada suhu 25-37⁰C. Beberapa suhu pengukuran enzim menggunakan suhu 37⁰C, namun belum ada standar suhu pengujian spesifik. Oleh karena itu, suhu pengukuran harus disebutkan dalam kasus-kasus pengukuran aktivitas (Palmer, 1991). Menurut Bergmeyer and Kunitz, dalam Hasnan (1991) bahwa pengukuran enzim bromelin pada suhu 37⁰C.

Metode yang paling banyak digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim protease pada daerah pengukuran ultraviolet yaitu 280 nm. Absorbansi ini akibat adanya absorbansi oleh asam amino aromatik. Pengukuran aktivitas enzim protease dapat juga pada daerah tampak atau visible yaitu pada panjang gelombang 500-750 nm, dimana penyerapannya didasarkan pada kompleks warna yang dihasilkan dari reduksi reagen folin oleh tirosin. Pengukuran pada daerah tampak mempunyai sensitifitas yang tinggi yaitu 10-20 kali dari pengukuran pada daerah ultraviolet (Lowry *et al.*, 1951). Menurut Bernabev (1979) bahwa bahwa pengukuran optimum untuk tirosin pada panjang gelombang 578 nm.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain konsentrasi enzim, waktu inkubasi, konsentrasi ion Hidrogen (H^+), kadar air dan temperatur.

1. Pengaruh konsentrasi enzim.

Menurut Martoharsono dan Rahayu (1977) bahwa pada konsentrasi enzim yang rendah tidak semua substrat diikat oleh enzim sehingga aktivitas enzim menurun. Jika konsentrasi enzim dinaikkan maka semakin banyak substrat yang terikat sehingga kecepatan reaksi bertambah. Hal ini berlangsung sampai mencapai tingkat kecepatan reaksi maksimum, dimana semua enzim mengikat substrat atau semua enzim telah jenuh. Enzim dikatakan jenuh apabila produk yang dihasilkan menurun.

2. Pengaruh waktu inkubasi.

Semakin waktu inkubasi menyebabkan daya kerja enzim untuk mengkatalisis lebih lama sehingga produk yang dihasilkan semakin besar (Indrawaty, 1983).

3. Pengaruh pH

Enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino maka pengaruh pH berhubungan erat dengan sifat asam basa yang dimiliki protein. Pada umumnya enzim menunjukkan aktivitas optimal pada kisaran pH optimal spesifik untuk jenis enzim tertentu. Aktivitas optimal enzim bromelin batang terhadap kasein pada pH optimum yang terletak sekitar pH 7. Aktivitas ini akan berkurang pada pH yang lebih besar dari 9. Apabila pH yang digunakan terlalu tinggi atau rendah akan terjadi perubahan yang disebut denaturasi protein (Meggy, 1992).

4. Pengaruh suhu

Semakin naiknya suhu maka meningkatkan kecepatan reaksi sampai batas tertentu. Tiap naik 10°C kecepatan reaksinya naik dua kali. Tetapi semakin tinggi suhu akan terjadi denaturasi enzim. Setiap enzim memiliki suhu optimum, diatas dan dibawah suhu tersebut aktivitas enzim berkurang karena energi kinetik yang diperlukan untuk interaksi substrat dan enzim rendah (Indrawaty, 1983).

2.4. Ikan lemuru (*Sardinella sp*).

Ikan lemuru banyak diproduksi di perairan laut Jawa namun nilai ekonomis yang dapat diperoleh dari hasil penjualan ikan lemuru relatif rendah karena mudah busuk dan bersisik banyak sehingga tidak banyak disukai untuk dikonsumsi dalam bentuk segar. Ciri-ciri ikan lemuru adalah bentuk badan panjang, sisik halus, keping tutup insang bawah menyudut dan tutup insang antara berbentuk setengah lingkaran. Dibagian bahu ada noda kuning kehijauan, warna badan keperakan sedang punggungnya gelap. Sirip-siripnya berwarna kekuningan dan sirip ekor kehitam-hitaman. Sedangkan panjang ikan dewasa rata-rata 15 cm.

Sistematika ikan lemuru menurut Blecker dalam Bahri (1990) adalah :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Kelas	: Fisches
Subkelas	: Telestoi
Ordo	: Malacoptergie
Subordo	: Clupeidae

Family : Clupeidae
 Genus : Sardinella
 Species : *Sardinella longiceps*.

Kandungan ikan lemuru dalam 100 gram ikan dapat dijelaskan pada tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Komposisi kimia lemuru tiap 100 gram.

Komponen	Jumlah
Air (gram)	76
Protein (gram)	20
Lemak (gram)	3
Karbohidrat (gram)	0
Ca ²⁺ (mgram)	20
Fosfor (mgram)	100
Fe (mgram)	1
Vitamin A (SI)	100
Vitamin B1 (mgram)	0.05

Sumber : Anonymous, 1980

Menurut Parakkasi (1980) bahwa komposisi asam amino dalam ikan dapat dijelaskan pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Komposisi Asam Amino dari protein ikan

Asam amino	Jumlah dari total protein ikan (%)
Arginin	0,2
Histidin	2,5
Isoleusin	8,5
Lisin	9,0
Metionin	3,7
Sistein	1,0
Fenilalanin	4,7
Tirosin	5,9
Trionin	5,1
Triptofan	1,5
Valin	7,1

2.5. Penentuan kadar protein

Titration formol merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein khususnya kadar protein terlarut. Prinsip dasar dari titration formol merupakan reaksi kesetimbangan asam basa yaitu kesetimbangan formaldehid dengan NaOH yang ditambahkan. Produk yang diperoleh pada

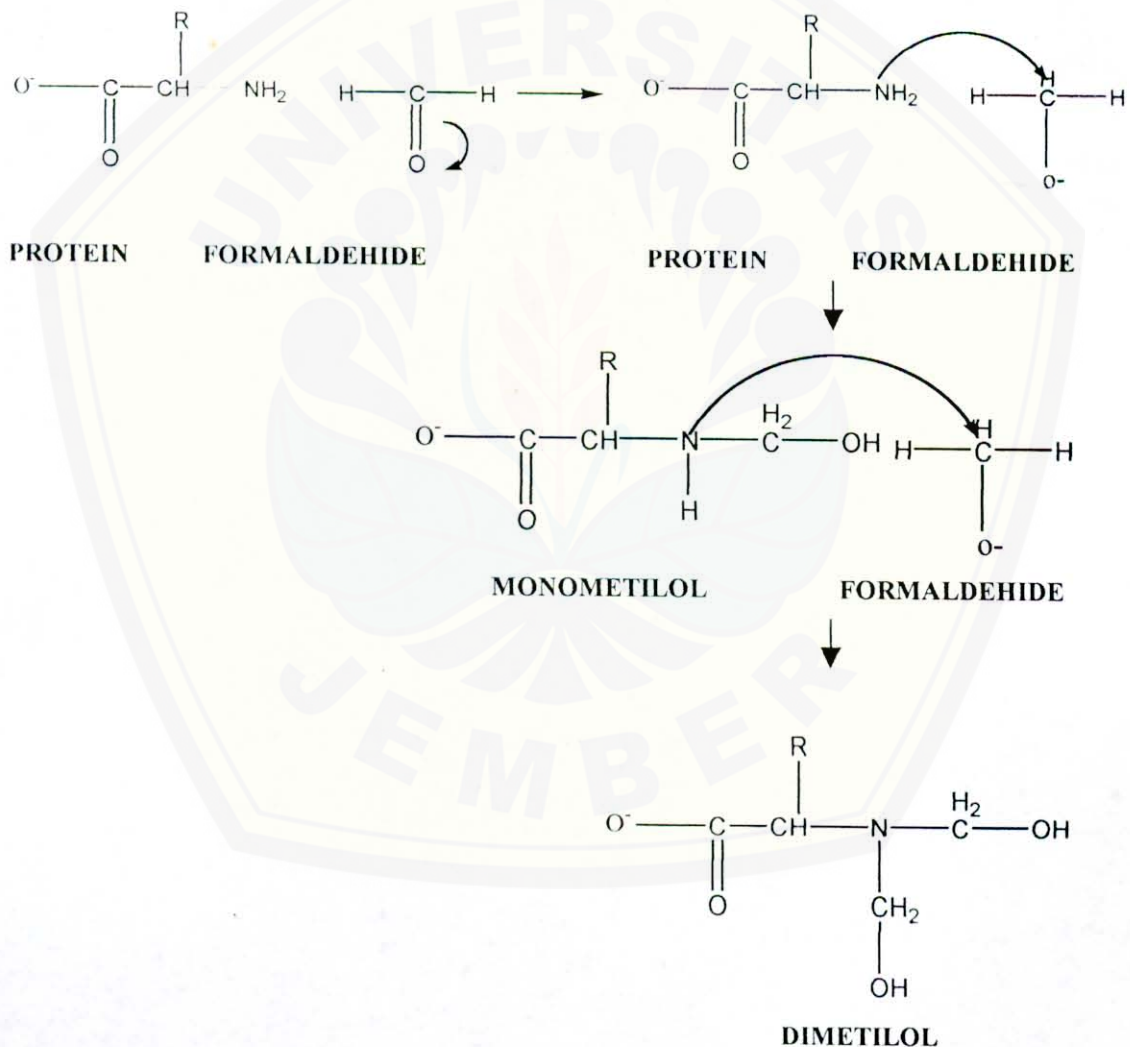
titrasi formol yaitu turunan metil-ol. Menurut Fessenden dan Fessenden (1986) bahwa pada saat basa ditambahkan, ion yang terprotonisasi sempurna diubah menjadi ion dipolar yang netral.



semakin banyak ditambahkan basa, semua bentuk kation diubah menjadi anion.



Menurut Sorensen (1987) bahwa mekanisme reaksi protein dengan formaldehid pada titrasi formol dapat dijelaskan pada gambar 4 dibawah ini

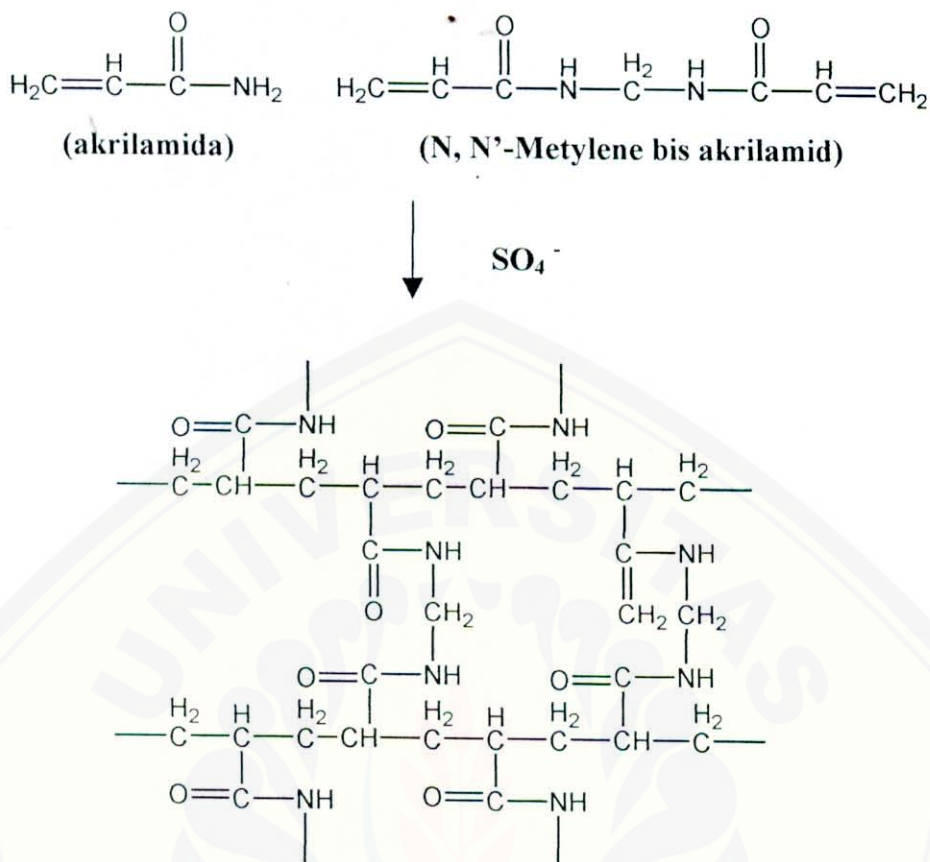


Gambar 4. Mekanisme reaksi protein dengan formaldehid pada titrasi formol

2.6. Pemisahan protein

Protein mempunyai muatan netto positif atau negatif yang mencerminkan campuran asam amino bermuatan yang dikandungnya. Jika sebuah larutan yang mengandung molekul protein mengalami suatu medan listrik, protein itu akan bermigrasi dengan laju yang bergantung pada muatan, ukuran, serta bentuknya. Teknik ini yang disebut elektroforesis. Elektroforesis merupakan salah satu metode yang digunakan untuk pemisahan protein atau enzim yang berada dalam suatu campuran.

Tahun 1960-an gel elektroforesis SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) telah mengawali dalam analisa protein. Metode ini menggunakan gel poliakrilamida dengan struktur yang saling silang (*cross linking*) yang dapat dilalui oleh protein-protein. Gel elektroforesis SDS PAGE digunakan untuk menentukan sub unit protein. Gel tersebut biasanya disiapkan langsung sebelum digunakan dengan cara polimerisasi dari monomer-monomernya. Ukuran pori gel dapat diatur dengan variasi konsentrasi agen *cross-linking* sehingga cukup kecil untuk menghambat migrasi molekul-molekul protein yang diminati. Konsentrasi *cross linking* yang banyak mengakibatkan ukuran pori kecil sehingga digunakan untuk analisa dengan berat molekul yang kecil. Konsentrasi *cross linking* yang rendah mengakibatkan ukuran pori menjadi besar sehingga digunakan untuk analisa dengan berat molekul yang besar. Ikatan *cross linking* pada gel polimerisasi terbentuk dari monomer-monomer akrilamida dan N, N'-methylene bis akrilamida. Proses polimerisasi disertai dengan penambahan *Ammonium Persulfate* sebagai inisiator dan N, N, N', N'-tetramethylene diamine (TEMED) sebagai katalis. Menurut Baker (1995) bahwa reaksi polimerisasi N, N'-methylene bis akrilamida dan akrilamida dapat dijelaskan pada gambar 5 .



Gambar 5. Reaksi polimerisasi akrilamida dan N, N'-methylene bis akrilamida untuk membentuk *cross linking* polyakrilamida

Protein-protein dicampur dengan deterjen yang bermuatan sangat negatif, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) yang berfungsi menguraikan struktur sekunder, tersier, dan kuartener melalui pengikatan SDS-protein pada bagian hidrofobik molekul-molekul protein sehingga molekul-molekul itu menjadi rantai polipeptida yang linier. Merkaptotanol ditambahkan sebagai agen pereduksi untuk mereduksi semua ikatan disulfida. Setiap molekul protein mengikat sebagian besar molekul-molekul deterjen yang bermuatan negatif sehingga muatan setiap molekul protein menjadi negatif. Hal tersebut menyebabkan molekul-molekul tersebut bermigrasi ke arah elektroda positif apabila mengalami tegangan listrik. Protein-protein yang berukuran sama cenderung menunjukkan perilaku yang serupa karena struktur yang semula telah dijadikan tidak terlipat lagi oleh SDS sehingga semua mempunyai bentuk yang sama dan masing-masing



III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler dan Biokimia Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember mulai bulan Nopember 2002 sampai Februari 2003.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

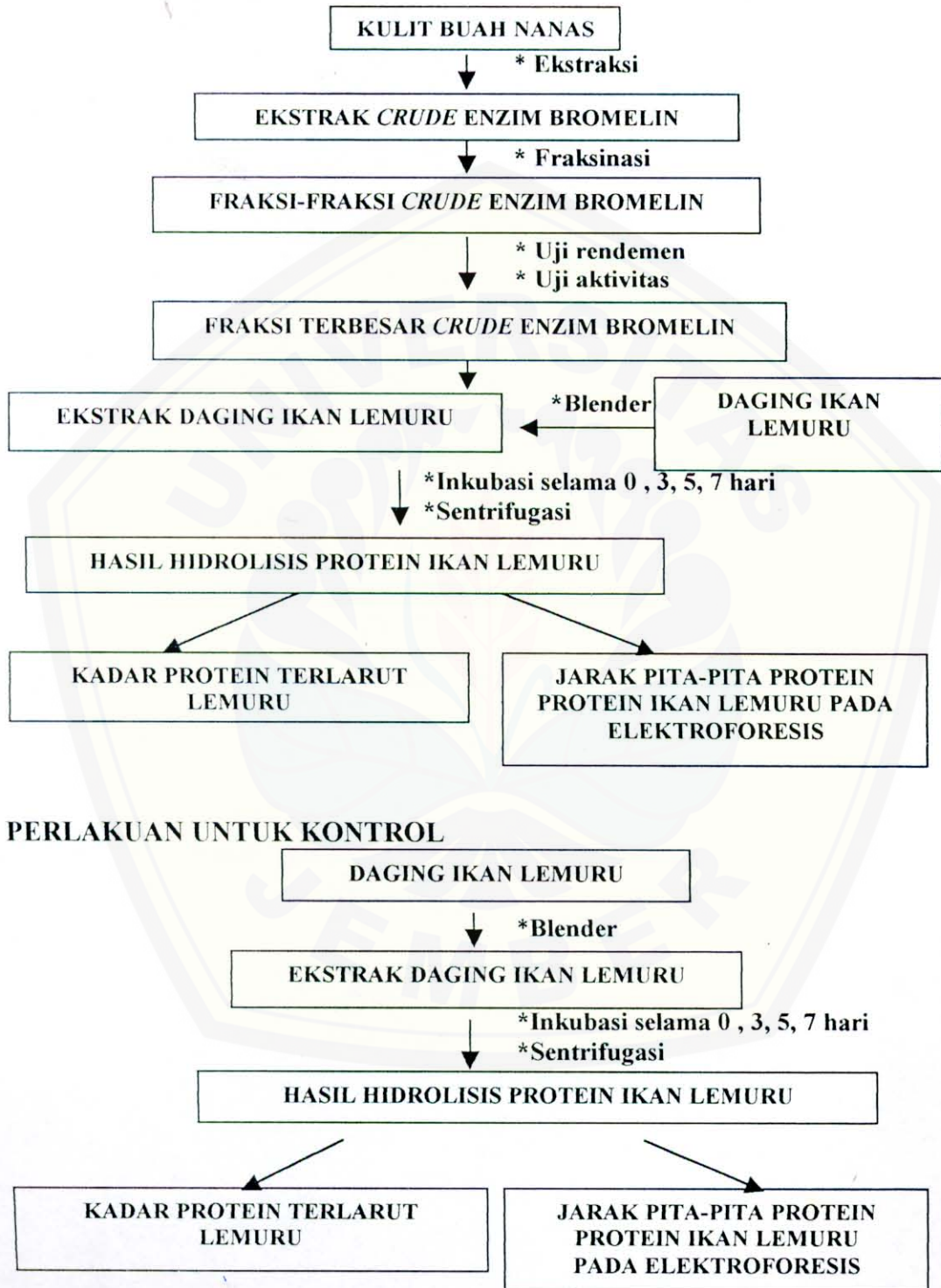
Peralatan yang digunakan meliputi blender, pipet volume, pipet *Mohr*, pipet tetes, tabung reaksi, gelas kimia, labu ukur dan labu erlemeyer, neraca analitis, biuret, pH meter merk Jenway, spektronik VIS 21 D, sentrifuga dingin merk Sorval, sentrifuga biasa merk ABA III, stopwatch, oven, *shaker water bath*, kertas saring dan perangkat elektroforesis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah kulit buah nanas varietas nanas Bogor (*dulcis*), daging ikan lemuru, Na-phospat, Ammonium sulfat, Kasein *Hammerstin*, Trikloroasetat, Tirosin, Kalsium klorida (II), Natrium karbonat, *Folin Cioulteau*, Natrium klorida, Kalium oksalat, Indikator Phenolptalein, Formaldehyde, Natrium hidroksida, asam oksalat, akrilamida, N' N' bis akrilamida, ammonium persulfat, tetraetilmtilen diamina, gliserol, *bromophenol blue*, alkohol 70%, *Coomasie Brilliant Blue*, Natrium Dodesil Sulfat, basa tris, glisin, merkaptoetanol dan Aquadest.

3.3. Diagram alir

Diagram alir penelitian dapat dijelaskan gambar 6 dibawah ini.



Gambar 6. Diagram alir penelitian

3.4. Metode penelitian

3.4.1. Ekstraksi *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanas dengan metode ekstraksi (Praptiningsih, 1989) dan metode Englard Seifter (Deutscher, 1990).

1. Tahap awal ekstraksi

Sebanyak 100 gram kulit buah nanas ditambah 100 mL buffer fosfat pH 7,0 kemudian diblender dan dilanjutkan dengan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm 15 menit pada suhu 4 °C sehingga dihasilkan supernatan dan endapan. Supernatan yang dihasilkan disebut ekstrak kasar enzim bromelin yang selanjutnya difraksinasi.

2. Tahap fraksinasi

Volume supernatan yang dihasilkan tersebut diukur untuk menentukan jumlah ammonium sulfat yang akan digunakan untuk mengendapkan protein. Jumlah ammonium sulfat ditambahkan secara bertahap yaitu fraksi 0-40%, fraksi 40-80% dan 80-100%. Untuk 1 liter sentrat, jumlah ammonium sulfat yang diperlukan yaitu 226 gram untuk fraksi 0-40%; 258 gram untuk fraksi 40-80% dan 139 gram untuk fraksi 80-100% (sesuai lampiran 2). Sebelum ditambahkan ammonium sulfat fraksi 0-40% maka supernatan diletakkan dalam gelas kimia tetapi disekitarnya diberi es batu untuk menjaga suhu tetap dingin. Ammonium sulfat dilarutkan pada supernatan sedikit demi sedikit dengan menggunakan pengaduk magnetik. Hasil yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 7500 rpm selama 15 menit sehingga menghasilkan endapan dan supernatan. Endapan yang dihasilkan kemudian ditimbang dan selanjutnya ditambahkan 50 mL buffer phospat pH 7. Supernatan yang diperoleh diperlakukan dengan cara yang sama untuk fraksi 40-80% dan fraksi 80-100%.

3.4.2. Penentuan aktivitas *crude* enzim bromelin kulit buah nanas dengan metode Bergmeyer (Hasnan, 1991)

a. Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0.2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan aquades 0.2 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya

ditambahkan TCA 0.1M sebanyak 2.0 mL dan enzim dalam $\text{CaCl}_2(2\text{mM})$ sebanyak 0.2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1.5 mL kemudian ditambah 0.4M Na_2CO_3 5.0 mL dan pereaksi folin 1.0 mL. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

b. Menyiapkan larutan standart

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0.2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan tirosin standart 0.2 mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0.1M sebanyak 2.0 mL dan enzim dalam $\text{CaCl}_2(2\text{mM})$ sebanyak 0.2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1.5 mL kemudian ditambah 0.4M Na_2CO_3 5.0 mL dan pereaksi folin 1.0 mL. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

c. Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 1 mL buffer fosfat 0.2M pH 7 ditambah substrat kasein 1 mL dan enzim dalam CaCl_2 0.2 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA 0.1M sebanyak 2.0 mL dan $\text{CaCl}_2(2\text{mM})$ sebanyak 0.2 mL. Kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diambil 1.5 mL kemudian ditambah 0.4M Na_2CO_3 5.0 mL dan pereaksi folin 1.0 mL. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Aktivitas *crude* enzim bromelin ditentukan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas} = \frac{\left(\frac{\text{Abs. sampel} - \text{Abs. blanko}}{\text{Abs. standart} - \text{Abs. blanko}} \times \text{faktor pengenceran} \right)}{\text{waktu inkubasi}}$$

Satuan unit aktivitas dinyatakan sebagai sejumlah *crude* enzim bromelin yang dapat memberikan nilai absorbansi setara dengan mikromol tirosin per menit pada kondisi pH 7 dan suhu 37⁰ C.

3.4.3 Inkubasi daging ikan lemuru dengan metode enzimatik

(Suprihno, 2002)

Sebanyak 100 gram daging ikan lemuru ditambahkan 200 mL aquades kemudian diblender. Sebanyak 10 gram ikan lemuru yang halus ditambahkan *crude* enzim bromelin (yang memiliki aktivitas tertinggi hasil pengukuran) dengan perbandingan 1:2 berat ikan lemuru tetapi untuk perlakuan blanko maka sampel tidak ditambahkan *crude* enzim bromelin Selanjutnya ditambahkan NaCl 20% dari berat ikan dan diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan lama inkubasi 0 hari, 3 hari, 5 hari, 7 hari. Setelah inkubasi, sampel dipanaskan selama 3 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan disaring. Filtrat dari hasil tersebut (ekstrak ikan) digunakan untuk penentuan kadar protein terlarut dengan titrasi formol dan pita-pita protein dengan metode elektroforesis.

3.4.4 Penentuan protein terlarut dengan metode titrasi formol (Sudarmadji, 1996).

a. Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 1 mL aquades ditambahkan 0.02 mL K- oksalat jenuh (K- oksalat : air = 1 : 3), 0.05 mL Phenolptalein 1%, 0.1 mL formaldehyde 40% kemudian dititrasi dengan NaOH 0.1 N (V1) sampai warna merah jambu.

b. Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 0.5 mL sampel (hasil hidrolisis ikan lemuru) ditambahkan 1 mL aquades, 0.02 mL K- oksalat jenuh (K-oksalat:air = 1:3), 0.05 mL Phenolptalein 1%, kemudian dititrasi dengan NaOH 0.1 N (V2) sampai warna merah muda. Selanjutnya ditambahkan 0.1 mL formaldehyde 40% dan dititrasi dengan NaOH 0.1 N (V3) sampai warna merah muda. Kadar protein terlarut ditentukan dengan rumus berikut :

$$\% N = \frac{V1.N1 - V3.N3}{\text{Berat sampel}} \times 14.008 \times 100\%$$

% Protein terlarut = % N x Faktor Konversi (6.25)

3.4.5 Penentuan pita-pita protein hasil hidrolisis ikan lemuru dengan metode elektroforesis (Sambrook yang dimodifikasi Ratnadewi, 2001)

a. Pembuatan gel elektroforesis SDS-PAGE

Pembuatan *separating gel* (gel bawah) 12.5% pH 8.8 dengan cara mencampurkan 4.0 mL akrylamida 30%, 2.5 mL *Tris HCl* 0.5 M pH 8.8, 100µL Natrium Dodesil Sulfat 10 % (w/v), 3.35 ml aquades steril, 50 µL Ammonium Persulfat 10% dan 5µL *Tetraetilmetilene diamine* (TEMED) diaduk dan dimasukkan kedalam *glass plate*. Pembuatan *stacking gel* 4% pH 6.8 dengan mencampurkan 0.665 mL akrylamida 30% , 1.25 mL *Tris HCl* 0.5 M pH 6.8, 50 µL Natrium Dodesil Sulfat 10 % (w/v), 3.05 ml Aquades steril, 25µL 10% Ammonium Persulfat dan 5µL (TEMED). Pembuatan gel, dibekukan dengan menuangkan gel bawah ke dalam *glass plate* yang sudah diset terlebih dahulu. Setelah gel bawah memadat, gel atas dituang diatas gel bawah tersebut dan dipasang "sisir" untuk cetakan sumur tempat sampel.

b. Preparasi sampel

Sebelum sampel protein ditempatkan dalam sumur gel, terlebih dahulu didenaturasi dengan mendidihkannya dengan buffer sampel yang telah

dipersiapkan terlebih dahulu (lampiran 1) selama 3 menit dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 3 menit.

c. Perlakuan sampel

Sebanyak 20 μL sampel protein diinjeksikan kedalam sumur-sumur gel elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 15 Volt sampai warna biru *bromophenol blue* telah mencapai 0,5 cm mencapai sisi bawah *separating gel*.

d. Pengecatan protein

Setelah elektroforesis selesai, gel dimasukkan kedalam larutan staining yang telah dipersiapkan terlebih dahulu (lampiran 1). Setelah 24 jam dalam larutan staining, gel dipindahkan kedalam larutan destaining dilakukan berulang kali sampai warna biru pita protein pada gel terlihat jelas.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Metode ekstraksi *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanas secara ekstraksi awal yang dilanjutkan fraksinasi menghasilkan rendemen tertinggi pada fraksi 40-80% sebesar 1.010 gram untuk 50 mL larutan.
2. Aktivitas tertinggi ekstrak *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanas terhadap kasein yaitu pada fraksi 40-80% sebesar 0.192 Unit.
3. Semakin meningkatnya waktu inkubasi menyebabkan semakin meningkatnya hasil hidrolisis protein daging ikan lemuru. Hal ini terlihat dari meningkatnya kadar protein terlarut daging ikan lemuru dengan kadar protein terlarut tertinggi pada hari ke 5 sebesar 6.875 % dan menipisnya penampakan pita-pita protein dan menjauhnya jarak pita-pita protein dari gel atas pada elektroforesis.

5.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut maka perlu dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pemurnian enzim bromelin pada tahap yang lebih tinggi misalnya dialisis, kromatografi penukar ion dan lain-lain.
2. Penentuan kondisi optimum enzim bromelin pada perlakuan suhu, konsentrasi, lama inkubasi dan pH.
3. Penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin.
4. Isolasi protein ikan lemuru untuk mengurangi pengaruh lemak terhadap hasil elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, Bruce. Dennis. Bra dan Julian L. 1994. *Biologi Molekuler Sel*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Anonymous. 1980. *Alcalase 0.6 L*. Denmark: Novo Industries
- _____. (Tanpa Tahun). *Mini-Protean II Electrophoresis Cell Instruction Manual Bio-Rad*.
- Azis, A. Judoamidjojo dan Endang G. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Bogor: PAU-Bioteknologi IPB
- Badan Pusat Statistik. 2003. <http://www.bps.go.id>.
- Bahri, S. 1990. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Dan Garam Dalam Pembuatan Kecap Ikan Lemuru (Sardinella sp.)*. Jember: Fakultas Teknologi Universitas Jember
- Baker, D. 1995. *Capillary Electroforesis*. Canada: John Wiley and Sons Inc.
- Bernabeu, C. 1979." Characteristic of Proteinase K From *Trigracium Albumlimber*". Dalam *Journal Biochemistry*. (1993). Amerika: Department of Food Nutrition and Marine Resources
- Boyer, R. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. California Benjamin/Clumming. Publishing Company Inc.
- Colby, D. 1985. *Ringkasan Biokimia Harper*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Deutscher, M. P. 1990. *Method In Enzymology Guide To Protein Purification*. San Diego: Academic Press
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga
- Fox, P. F. 1991. *Food Enzymology*. New York: Elsevier Applied Science
- Hasnan, M. 1991. *Pengaruh Penggunaan Enzim Papain Selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan*. Bogor: Jurusan TPG FATETA Institut Pertanian Bogor
- Hendritomo, H. Siswa S. dan Suwendo H. 2000. "Memberdayakan Nelayan via Teknologi Enzimatik Kecap Ikan". Dalam *Jawa Pos*. Jakarta: Halaman 6
- Indrawaty. 1983. *Pembuatan Kecap Keong Sawah Dengan Menggunakan Enzim Bromelin*. Jakarta: Balai Pustaka

- James, J. M. Rick M. hem. Awesly B. and Samuel B. (Tanpa Tahun). *Pre-Lab For Fish Protein Lab Analysis Of Protein By SDS-PAGE Electroforesis*. [http://www-department.oxy.edu/tops/fish protein/fish pre-post.htm-250k](http://www-department.oxy.edu/tops/fish%20protein/fish%20pre-post.htm-250k)
- Laporan Dinas Perikanan. 1998. "Ketidakpedulian Pemerintah Pada Nelayan Muncar Adalah Lagu Lama". Dalam *Kompas*. [http://www.forek.or.id/detail.php? rubrik=feature &berita&benda ID=1164-19k](http://www.forek.or.id/detail.php?rubrik=feature&berita&bendaID=1164-19k).
- Lehninger. 1990. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Airlangga
- Lowry, O. H. Rosebrough N. J., Farn A. L and Randall R. J.. 1951. " The Lowry Assay". Dalam *Journal Biochemistry* (193:265). <http://www-class.unl.edu/biochem/protein-assay/lowry-assay.htm-11k>
- Martoharsono dan Rahayu. 1977. *Enzimologi*. Yogyakarta: Yayasan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada
- Mathews C. and. Van Holde K. E. 1990. *Biochemistry*. Canada: Benjamin Publishing Company Inc.
- Meggy, T.S. 1992. *Protease*. Bandung: Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Teknologi Bandung
- Meyer, L. H. 1974. *Food Chemistry*. New York: Modern Asia ed Reinloed Publishing Co.
- Moeljanto. 1992. *Pengalengan Ikan penanganan Ikan Segar Pengawetan dan pengolahan Hasil Perikanan*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Norris, J. R. and D. W. Ribbons. 1971. *Method In Enzymology*. London: Academic Press Inc
- Omar, S. Idrus, O dan Razak. 1978. *Extraction And Activity Of Bromelain From Pinneapple*. Mardi Ress Bull
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzyme*. New York: Ellis Haward
- Parakkasi, A. 1980. *Ilmu Gizi Dan Makanan Ternak*. Bogor: Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Praptiningsih, Y. 1989. *Isolasi Dan Pemurnian Enzim Bromelin Dari Bonggol Nanas*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

- Ratnadewi, A.A.I. 2001. *Studi Ekspresi Mutan Sup45 Hiperaktif Sup45 Hipersensitif Paramomisin Dan Sensitif Temperatur Saccharomyces cerevisiae*. Bandung: Bidang Khusus Biokimia Program Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung
- Reed, G. 1975. *Enzymes In Food Processing*. New York: Academic Press
- Robyt, J. F and White J. 1987. *Biochemical Technic Theory And Practical*. New York: Kluwer Academic Publisher
- Santoso, A. 1997. *Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Perdagangan Terhadap Rendemen Minyak Ikan Lemuru (Sardinella longiceps) Pada Isolasi Secara Enzimatis*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya
- Sorensen S. P. L. 1987. "Sorensen Formol Titration". Dalam *Jurnal Biochemistry*. <http://www.liv.ac.uk/chemistry/link/reaction.html-44k>
- Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimia*. Yogyakarta: Liberty.
- Suprihno. 2002. *Pengaruh Berat Buah Nanas (Ananas Comusus Var. dulcis) Dan Lama Inkubasi Terhadap Kualitas Kecap Ikan Yang Dibuat Secara fermentasi*. Jember: FKIP Program Studi Biologi Universitas Jember
- Tokkong. 1979. *Proses Pelarutan Protein Ikan Secara Enzimatis*. Bandung: Institut Teknologi Bandung
- Whitaker, J. R. 1994. *Principle Of Enzymology For The Food Science*. New York: Marcel Deccker
- Winarno, F.G. 1999. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia
- Yandri, A. S. 1987. *Isolasi Enzim Bromelin Dari Berbagai Bagian Tanaman Nenas (Ananas comusus)*. Bandung: Jurusan Teknologi Makanan

LAMPIRAN 1

Preparasi larutan

1. Buffer fosfat 0.2 M pH 7

Sebanyak 6.9 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_r=137.99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL.

Sebanyak 8.9 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_r=177.99$) dilarutkan dengan aquades sampai 250 mL. Untuk membuat buffer fosfat 0.2 M pH 7 maka larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ditambahkan pada larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sampai pH mencapai pH 7 pada pH meter.

2. Kasein 20 mg/mL pH 7

Sebanyak 0.2 gram kasein *Hammerstin* ditambahkan 5 mL larutan NaOH 0.1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai kasein larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan larutan buffer fosfat 0.2 M pH 7 sampai 10 mL.

3. Larutan CaCl_2 2mM

Sebanyak 0.011 gram CaCl_2 ($M_r=111$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

4. Larutan Trikloro asetat 0.1 M

Sebanyak 0.818 gram Trikloro asetat ($M_r=163.5$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL.

5. Larutan Na_2CO_3 0.4 M

Sebanyak 2.12 gram Na_2CO_3 ($M_r=106$) dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL

6. Larutan Folin (1:2)

Sebanyak 6 mL larutan folin cioulteau ditambahkan 2 mL aquades.

7. Larutan tirosin 5 mmol/L

Sebanyak 0.023 gram tirosin ($M_r=181$) ditambahkan dengan 12.5 mL larutan NaOH 0.1 N dan diletakkan pada penangas sambil diaduk dengan pengaduk magnetik sampai larut. Kemudian didinginkan dan ditambahkan aquades sampai 25 mL

8. Larutan enzim dalam CaCl_2 (2:1)
Sebanyak 0.4 mL ditambahkan 0.2 mL CaCl_2 2 mM
9. Larutan Kalium oksalat jenuh (1:3)
Sebanyak 1 mL larutan Kalium oksalat jenuh ditambahkan 3 mL aquades
10. Larutan indikator phenolptalein 1% w/v
Sebanyak 0.5 gram phenolptalein dilarutkan dengan alkohol (etil alkohol) 70% sampai 50 mL
11. Larutan formaldehide 40 % v/v
Sebanyak 20 mL larutan formaldehide dilarutkan dengan aquades sampai 50 mL
12. Akrylamida/bis (30% w/v) (Anonymous, Tanpa Tahun)
Sebanyak 29.2 gram akrylamida ditambahkan 0.8 gram N[']N[']-bis-methylene akrylamida dan dilarutkan dengan penambahan aquades steril sampai volume 100 mL
13. Tris HCL 1.5 M pH 8.8
Sebanyak 15 gram basa Tris (Mr=122) dilarutkan aquades steril sampai 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 8.8 dengan menggunakan alat pH meter.
14. Tris HCL 0.5 M pH 6.8
Sebanyak 3 gram basa Tris dilarutkan aquades steril sampai volume 50 mL. Kemudian ditambahkan 6 N HCL sedikit demi sedikit sampai pH 6.8 dengan menggunakan alat pH meter.
15. Natrium Dodesil Sulfat 10% w/v
Sebanyak 2.5 gram Natrium Dodesil Sulfat dilarutkan aquades steril sampai volume 25 mL .
16. Buffer sampel
Sebanyak 1.9 mL aquades steril ditambahkan 0.5 mL *Tris HCl* pH 6.8, 0.4 mL glycerol , 0.8 mL 10% (w/v) Natrium Dodesil Sulfat, 0.2 mL 2-merkaptotanol, 0.2 mL 1% (w/v) *bromofenol blue*. Sampel dilarutkan dengan perbandingan 1 : 4 kemudian dipanaskan 95 °C selama 4 menit.

17. Buffer elektrode

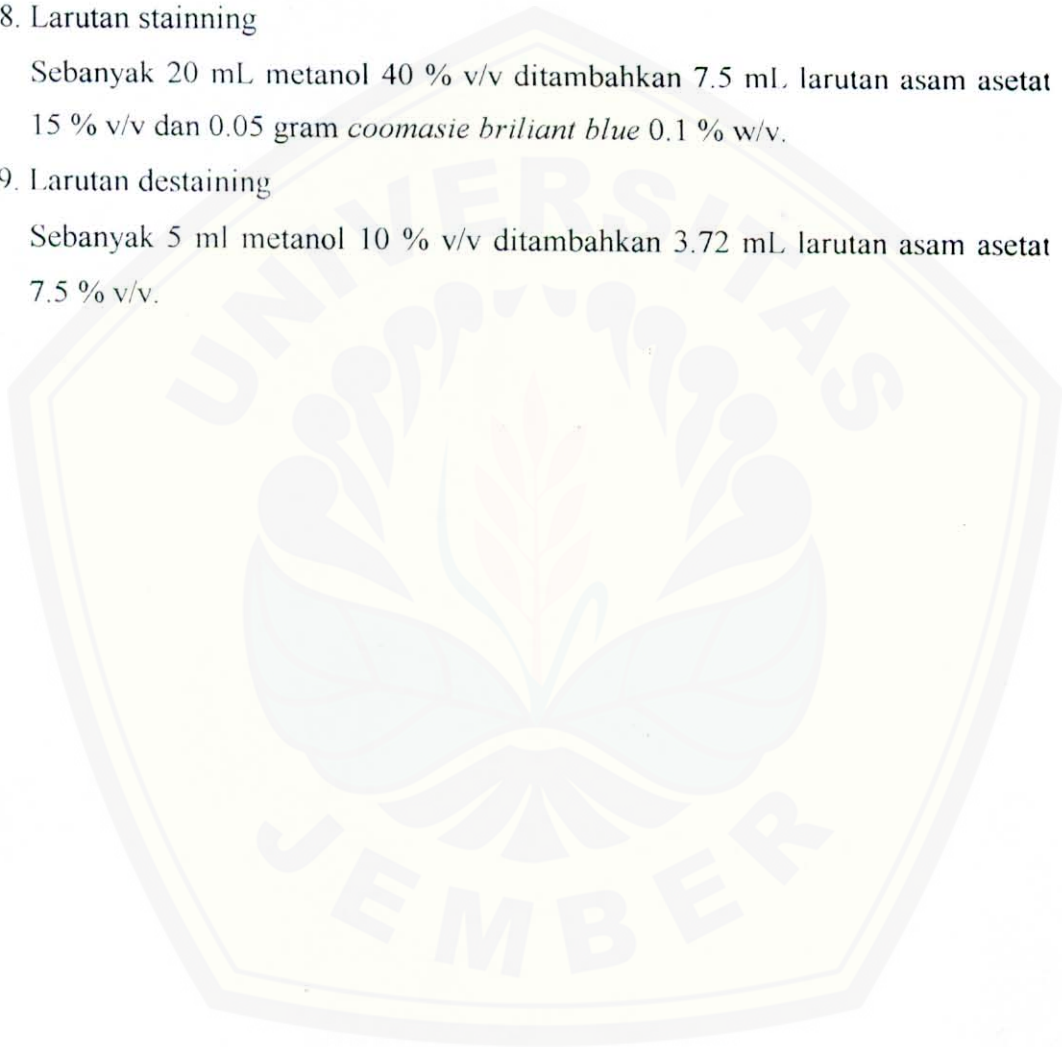
Sebanyak 1.5 gram Basa Tris ditambahkan 7.2 gram glisin, 0.5 gram Natrium Dodesil Sulfat dan aquades steril sampai 100 mL. Disimpan pada 4⁰C. Untuk satu elektroforesis run melarutkan 10 mL 5X stock dengan 40 mL aquades steril.

18. Larutan staining

Sebanyak 20 mL metanol 40 % v/v ditambahkan 7.5 mL larutan asam asetat 15 % v/v dan 0.05 gram *coomasie brilliant blue* 0.1 % w/v.

19. Larutan destaining

Sebanyak 5 ml metanol 10 % v/v ditambahkan 3.72 mL larutan asam asetat 7.5 % v/v.



LAMPIRAN 2

Teknik pengendapan oleh ammonium sulfat

Tabel 7. Konsentrasi akhir ammonium sulfat: persen penjumlahan pada 0°C

Kons. awal %ams. pada 0°C)	Persentase penjumlahan pada 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	679
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	45	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Sumber : "Data for biochemistry reseach "(R. M. C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, and K. M. Jones, eds.), 2 nd Ed. Oxford Univ. Press, London, 1969 (Deutscher, 1990)

LAMPIRAN 3

Penentuan aktivitas *crude* enzim bromelin dari kulit buah nanasTabel 8. Data absorbansi blanko, standart dan sampel tiap 50 mL larutan *crude* enzim bromelin.

Fraksi (%)		Absorbansi			Rerata	Standart Deviasi	Standr- blanko	Sampel- blanko	Unit
		Ul.1	Ul.2	Ul.3					
Eks.	Blanko	0.632	0.632	0.630	0.631	0.0010	0.250	0.073	4.818
Kasar	Standart	0.881	0.880	0.883	0.881	0.0020			
	Sampel	0.703	0.700	0.710	0.704	0.0050			
0-40	Blanko	0.033	0.030	0.028	0.028	0.0030	0.464	0.004	0.142
	Standart	0.461	0.479	0.485	0.492	0.0130			
	Sampel	0.036	0.034	0.033	0.032	0.0020			
40-80	Blanko	0.032	0.033	0.032	0.035	0.0006	0.429	0.005	0.192
	Standart	0.526	0.502	0.461	0.519	0.0330			
	Sampel	0.038	0.038	0.037	0.040	0.0006			
80-100	Blanko	0.054	0.054	0.053	0.054	0.0006	0.368	0.003	0.135
	Standart	0.441	0.435	0.443	0.422	0.0040			
	Sampel	0.057	0.057	0.056	0.057	0.0006			

Pengukuran unit aktivitas enzim bromelin dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\left(\frac{\text{Abs. sampel} - \text{Abs. blanko}}{\text{Abs. standart} - \text{Abs. blanko}} \times \text{faktor pengenceran} \right)}{\text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan : Faktor pengenceran 165 X

Waktu inkubasi 10 menit

LAMPIRAN 4

Penentuan kadar protein terlarut daging ikan lemuru terhidrolisis.

Tabel 9. Data volume NaOH dan penentuan kadar protein terlarut untuk 10 gram ikan lemuru.

Sampel	Volume NaOH			Rerata	Persen Nitrogen	Persen protein terlarut
	Ul. 1	Ul. 2	Ul. 3			
Kontrol	6.3	6.7	8.0	7.0	1.057	6.631
0 hari	6.0	5.4	6.8	6.1	1.069	6.654
3 hari	6.7	4.8	5.0	5.5	1.078	6.733
5 hari	3.7	3.9	2.7	3.4	1.107	6.875
7 hari	5.2	4.0	5.5	4.9	1.086	6.668

Penentuan % protein terlarut dengan rumus dibawah ini

$$\% N = \frac{V1 \cdot N1 - V3 \cdot N3}{\text{Berat sampel}} \times 14.008 \times 100 \%$$

$$\% \text{ Protein terlarut} = \% N \times \text{Faktor (6.25)}$$

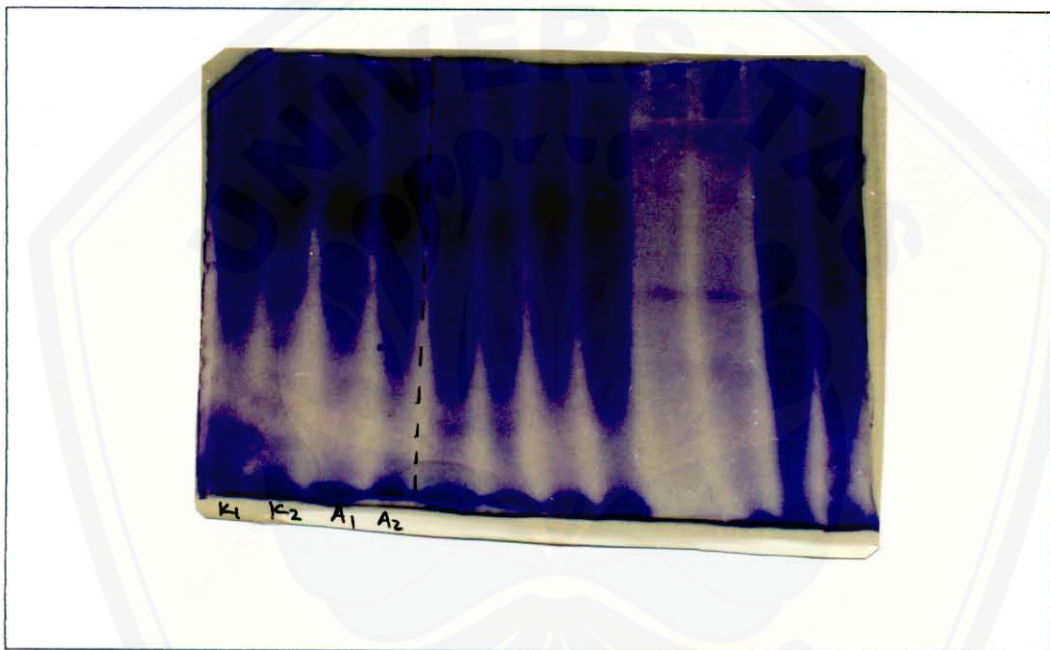
Keterangan : V1 = Volume NaOH Blanko (82.4 mL)
 V3 = Volume NaOH perlakuan (pada tabel diatas)
 N1 dan N3 = Normalitas NaOH (0.1 N)

LAMPIRAN 5

Daftar gambar elektroforegram

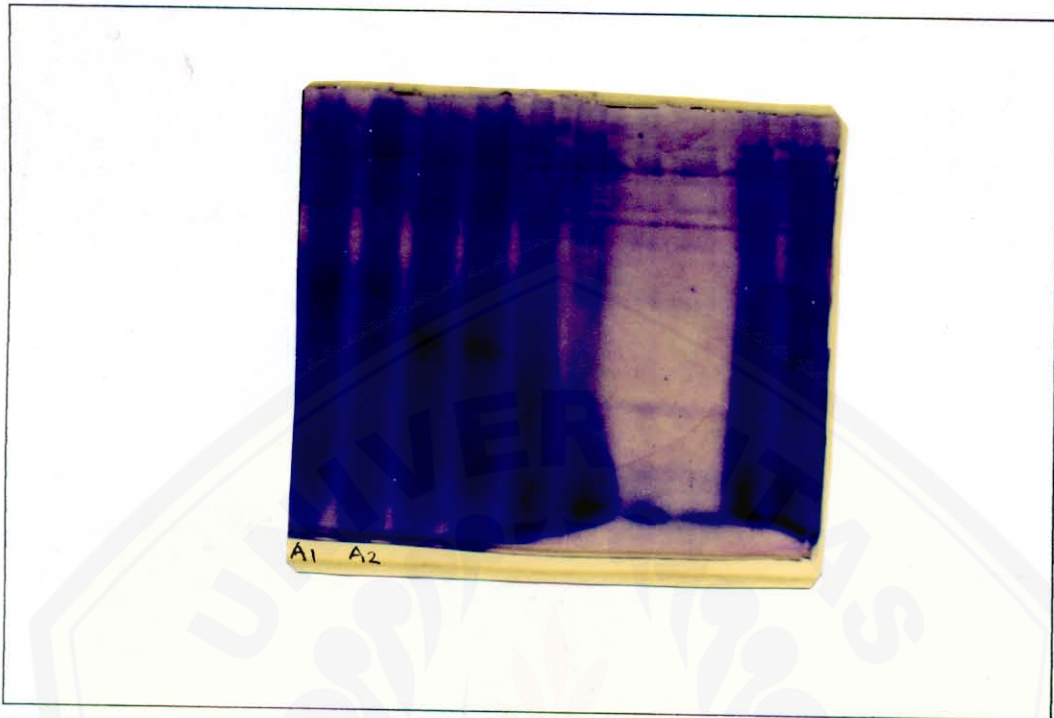
Gambar elektroforegram hasil hidrolisis daging ikan lemuru oleh enzim bromelin dari kulit buah nanas terhadap variasi lama inkubasi dicantumkan pada gambar 10, 11, 12 dan 13.

3.1 Lama inkubasi 0 hari



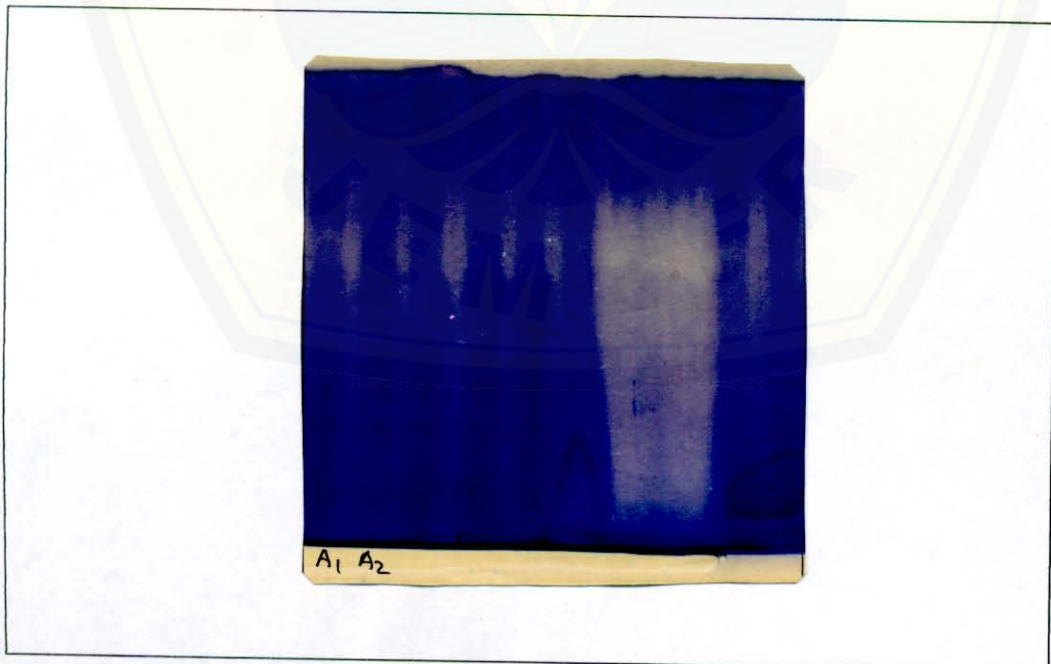
Gambar 10. Elektroforegram protein daging ikan lemuru yang terhidrolisis pada 0 hari. Lajur K1K2= Kontrol; Lajur A1A2= hidrolisis protein oleh kulit buah nanas

3.2 Lama inkubasi 3 hari



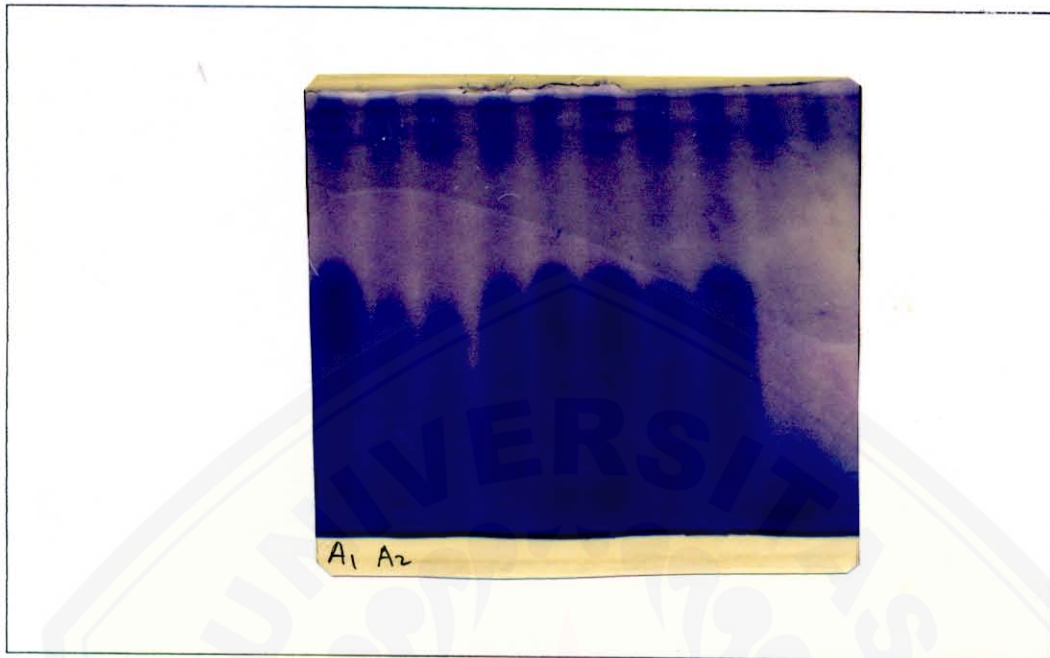
Gambar 11. Elektroforegram protein daging ikan lemuru yang terhidrolisis pada 3 hari. Lajur A1A2= hidrolisis protein oleh kulit buah nanas;

3.3 Lama inkubasi 5 hari



Gambar 12. Elektroforegram protein daging ikan lemuru yang terhidrolisis pada 5 hari. Lajur A1A2= hidrolisis protein oleh kulit buah nanas

3.4 Lama inkubasi 7 hari



Gambar 13. Elektroforegram protein daging ikan lemuru yang terhidrolisis pada 7 hari. Lajur A1A2= hidrolisis protein oleh kulit buah nanas.

